Iranian Food Science and Technology
Research Journal
Homepage: https://ifstrj.um.ac.ir

Research Article
Vol. 20, No. 1, Mar.-Apr., 2024, p. 135-152

Production and Evaluation of Caffeine Nanochitosome and Instant Drink Powder Enriched with It

R. Shaddel[1]*, Sh. Rajabi-Moghaddam[2]

1 and 2- Associate Professor and M.Sc Graduated in Food Science & Technology, Department of Food Science & Technology, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran, respectively.
(*- Corresponding Author Email: r.shaddel@uma.ac.ir)

Received: 15.01.2023 Revised: 09.05.2023 Accepted: 10.05.2023 Available Online: 13.05.2023	**How to cite this article:** Shaddel, R., & Rajabi-Moghaddam, Sh. (2024). Production and evaluation of caffeine nanochitosome and instant drink powder enriched with it. *Iranian Food Science and Technology Research Journal, 20*(1), 135-152. (In Persian with English abstract). https://doi.org/10.22067/ifstrj.2023.80391.1231

Introduction

Caffeine is one of the most common bioactive compounds in the world that can enhance mental and physical performance However its bitter taste has created challenges for the use of this compound in food. Nano-encapsulation technology, such as the use of liposomes, is one of the simplest ways to overcome this issue. In this research, caffeine was encapsulated in nanoliposomes coated with chitosan and then the drink powder enriched with caffeine nanochitosome was produced.

Materials and methods

In this research, pure caffeine powder was purchased and stored in dry environment at room temperature. Ethanol (96%) and acetic acid were obtained from Mojallali Company, Tween 80 from Merck Company (Germany), lecithin (P3556), cholesterol (C8667), and chitosan (medium molecular weight) purchased from Sigma Aldrich Company (Germany). Sugar, essential oil and citric acid used in the formulation of the drink were purchased from a local store.

First, nanochitosomes in ratios of 9:1, 8:2 and 7:3 lecithin-cholesterol, were prepared using thin-layer hydration method. Then, the particle size and zeta potential were measured to determine the characteristics of the produced particles. Encapsulation efficiency was measured for 9:1, 8:2 and 7:3 lecithin-cholesterol ratios. The stability of the chitosomal sample with a ratio of 9:1 lecithin-cholesterol was evaluated through visual observation of precipitation formation and the amount of release of encapsulated caffeine during 60 days of storage at ambient temperature was calculated. FTIR was performed for each of the components of the wall of chitosomes, caffeine powder, chitosomal solution containing caffeine and chitosomal solution without caffeine with a ratio of 9:1 lecithin-cholesterol. Nanochitosomes with 9:1 lecithin-cholesterol ratio were used in the formulation of beverages due to having the smallest particle size, favorable zeta potential, the highest microencapsulation efficiency, and high stability during storage. The drink samples were prepared in different formulations (samples containing 3 and 5% free caffeine solution, samples containing 3 and 5% chitosomal caffeine solution and the control sample). Then, the drinks were evaluated in terms of sensory characteristics and other physico-chemical characteristics (pH, acidity, Brix degree, etc.). The drinks produced were turned into powder with a freeze-dryer machine, and two important characteristics of powdered products, i.e. water solubility index and their hygroscopicity, were evaluated.

Results and Discussion

https://doi.org/10.22067/ifstrj.2023.80391.1231

The average particle size and zeta potential for different ratios of lecithin -cholesterol were obtained in the range of 133.3-443.6 nm and +40.96 to +48.36, respectively. The encapsulation efficiency for 9:1, 8:2 and 7:3 lecithin-cholesterol ratios were 91.2%, 86.18% and 79.09 %, respectively. The chitosomal sample with 9:1 lecithin-cholesterol ratio showed good stability during 60 days of storage at ambient temperature. FTIR results showed that caffeine was loaded in nanochitosomes. The results of the sensory evaluation of the prepared beverages showed the acceptability of the taste of the samples containing caffeine nanochitosome compared to the samples containing free caffeine, which indicates the success of chitosomal nanocarriers in covering the bitter taste of caffeine. The results of measuring the color of different drink samples showed that there is no significant difference between the color of samples. The results of measuring pH and acidity did not show significant differences between different drink samples. The results of measuring the solubility of different drink powder samples showed that the samples containing caffeine nanochitosomes have low solubility compared to other drink powder samples. Also, the hygroscopic amount of the drink powder containing caffeine nanochitosomes was lower than the other samples, which is considered as an advantage for powdered products.

The results obtained in this research showed that nanochitosomes are an efficient system in covering the bitter taste of caffeine. Therefore, with the production of caffeine nanochitosomes and its usage in the formulation of powder drinks, it is possible to produce energizing and desirable drinks without the need to use high amounts of sucrose.

Keywords: Bioactive compounds, Chitosan, Encapsulation, Instant drink powder

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
https://ifstrj.um.ac.ir

مقاله پژوهشی

جلد ۲۰، شماره ۱، فروردین-اردیبهشت ۱۴۰۳، ص. ۱۵۲-۱۳۵

تولید و ارزیابی نانوکیتوزوم کافئین و پودر نوشیدنی فوری غنی‌سازی شده با آن

رضوان شاددل [۱*]– شادی رجبی مقدم [۲]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۲۵
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۲/۲۰

چکیده

در این پژوهش، ریزپوشانی کافئین در نانولیپوزوم‌های پوشش‌داده شده با کیتوزان به‌منظور کاهش طعم تلخ این ترکیب، و سپس تولید پودر نوشیدنی غنی‌شده با آن صورت گرفت. ابتدا نانوکیتوزوم‌ها، در نسبت‌های ۱:۹، ۲:۸ و ۳:۷ لستین-کلسترول، با روش هیدراتاسیون لایه نازک تهیه شدند. میانگین اندازه ذرات و پتانسیل زتا برای نسبت‌های مختلف لستین-کلسترول، به ترتیب در محدوده ۴۴۳/۶- ۱۳۳/۳ نانومتر و ۴۰/۹۶+ تا ۴۸/۳۶+ بدست آمد. نمونه کیتوزومی با نسبت ۱:۹ لستین-کلسترول، پایداری خوبی را در طول ۶۰ روز نگهداری نشان داد. نانوکیتوزوم‌های دارای نسبت ۱:۹ لستین-کلسترول در فرمولاسیون نوشیدنی‌ها استفاده شدند. نمونه‌های نوشیدنی پس از تهیه شدن در فرمولاسیون‌های مختلف (نمونه‌های حاوی ۳ و ۵٪ محلول آزاد کافئین، نمونه‌های حاوی۳ و ۵٪ محلول کیتوزومی کافئین و نمونه‌ی شاهد)، مورد ارزیابی حسی قرار گرفتند که نتایج نشان‌دهنده‌ی مقبولیت طعم نمونه‌های حاوی نانوکیتوزوم کافئین در مقایسه با نمونه‌های حاوی کافئین آزاد بود. سپس، نوشیدنی‌ها از نظر خصوصیات فیزیکی و شیمیایی (pH، اسیدیته، درجه بریکس و رنگ) ارزیابی شدند. در ادامه، نوشیدنی‌ها با استفاده از دستگاه خشک‌کن انجمادی به شکل پودر درآمدند تا ویژگی‌های شاخص انحلال‌پذیری آب و هیگروسکوپی آن‌ها مورد ارزیابی قرار گیرند. نتایج حاصل از اندازه‌گیری میزان انحلال‌پذیری و هیگروسکوپی پودر نوشیدنی‌ها، نشان داد که نمونه‌های حاوی نانوکیتوزوم کافئین انحلال‌پذیری و هیگروسکوپی پایینی نسبت به سایر نمونه‌ها دارند. نتایج کلی این پژوهش، نشان‌دهنده‌ی کارآمد بودن نانوکیتوزوم‌ها در پوشش‌دهی طعم تلخ کافئین بود. لذا با تولید نانوکیتوزوم‌های کافئین و استفاده از آن در فرمولاسیون پودر نوشیدنی‌ها، می‌توان نوشیدنی‌های انرژی‌زا، بدون نیاز به استفاده از مقادیر بالای ساکارز تولید کرد.

واژه‌های کلیدی: پودر نوشیدنی فوری، ترکیبات زیست فعال، ریزپوشانی، کیتوزان

مقدمه

طی سالیان اخیر، محققان به‌دنبال راهی برای افزایش سطح هوشیاری افراد در طول عملیات‌های سخت و طولانی مدت هستند. کافئین (۱، ۳، ۷-تری متیل گزانتین)، یکی از رایج‌ترین ترکیبات زیست فعال در جهان است که می‌تواند عملکرد ذهنی را افزایش داده، خستگی را از بین برده و افسردگی را کاهش دهد (Seyedabadi *et al*., 2021). مصرف مقادیر متوسط کافئین (۲۰۰ تا ۳۰۰ میلی‌گرم) با کاهش غلظت آدنوزین در مغز همراه است که در نتیجه‌ی آن هوشیاری مصرف‌کننده بیشتر شده و فرد فعال‌تر و پرانرژی‌تر می‌شود (Chow *et al*., 2019). نوشیدنی‌های انرژی‌زا، چای و قهوه معمولاً حاوی مقادیر زیادی کافئین هستند (Ilgaz *et al*., 2018). کافئین خالص، به شکل پودر کریستالی سفید رنگ، با طعم و مزه‌ی تلخ است (Sivrikaya, 2020). به‌طور معمول، در محصولات غذایی از ساکارز همراه با سایر طعم دهنده‌ها، برای پوشاندن طعم تلخ این ترکیب استفاده می‌شود (Islam *et al*., 2016). علاوه‌براین، مصرف دوزهای بالای کافئین باعث ایجاد اثرات منفی مانند اضطراب، بی‌قراری، بی‌خوابی و بیماری‌های قلبی-عروقی

۱ و ۲- به‌ترتیب دانشیار و دانش‌آموخته کارشناسی ارشد علوم و مهندسی صنایع غذایی، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران
(*- نویسنده مسئول: Email: r.shaddel@uma.ac.ir)

https://doi.org/10.22067/ifstrj.2023.80391.1231

می‌گردد (Ilgaz *et al.*, 2018). با توجه به طعم تلخ کافئین و عوارض ناشی از مصرف مقادیر بالای آن، طراحی سیستمی برای پوشاندن طعم و آزادسازی کنترل شده این ترکیب، طی مدت زمان طولانی ضروری است. یکی از بهترین راهها برای غلبه بر این چالش، فناوری ریزپوشانی است (Solghi *et al.*, 2020). امروزه لیپوزومها یکی از کاربردی‌ترین سیستم‌های ریزپوشانی ترکیبات زیست‌فعال می‌باشند. نانولیپوزومها (نسخه‌ی نانومتری لیپوزومها)، حامل‌های کلوئیدی با ساختار توده‌ای (وزیکولی) هستند که از یک هسته آبی محصور شده توسط یک دولایه لیپیدی آبگریز (فسفولیپیدها) ایجاد می‌شوند (Pezeshky *et al.*, 2016). این ساختارها با استفاده فسفولیپیدها (عمدتاً لسیتین) از طریق روش‌های مختلف تولید می‌شوند. دو روش اصلی عبارتند از: روش هیدراتاسیون لایه نازک، که نیاز به مقداری کلسترول و تبدیل محلول فسفولیپید به یک لایه نازک از طریق تبخیر حلال دارد، و نیز روش بدون کلسترول که استفاده از کلسترول را از طریق جایگزین کردن آن با حلال‌هایی مانند گلیسرول و حرارت دادن در حمام آب، حذف می‌کند (Ghorbanzade *et al.*, 2016). امکان تولید در مقیاس بالا با استفاده از مواد طبیعی (تخم‌مرغ، سویا و شیر)، امکان محصورسازی همزمان ترکیبات محلول در آب و محلول در چربی در یک ساختار، قابلیت هدف‌گذاری ترکیبات زیست فعال و بازده ریزپوشانی بالا از مهم‌ترین مزیت‌های سیستم‌های لیپوزومی در مقایسه با سایر سیستم‌های محصورسازی می‌باشند (Ghorbanzade *et al.*, 2016). با این وجود، پایداری فیزیکی پایین و آزادسازی سریع ترکیبات محصور شده در مدت زمان نگهداری، از محدودیت‌های اصلی سیستم‌های لیپوزومی هستند (Muhamad *et al.*, 2019; Sarabandi & Jafari, 2020). لذا به منظور افزایش پایداری و ثبات نانولیپوزومها و نیز افزایش ماندگاری ترکیبات محصور شده، ترکیباتی مانند کربوهیدرات‌ها و یا مشتقات پروتئین ممکن است در ساختار آن‌ها بکار گرفته شود (Subramani, 2020). در بین پلیمرهای زیستی رایج برای پوشش‌دهی سطحی نانولیپوزومها، کیتوزان گزینه‌ی مناسبی برای این امر است زیرا به علت سهولت در دسترسی و داشتن بار مثبت می‌تواند به‌عنوان لایه‌ای در سطح خارجی نانولیپوزومها استفاده شود. کیتوزان با کاهش سیالیت غشا و سرعت همجوشی نانوساختارها، ثبات آن‌ها را افزایش می‌دهد (Seyedabadi *et al.*, 2021). بنابراین، با ریزپوشانی کافئین در نانولیپوزوم‌های پوشش داده شده با کیتوزان (نانوکیتوزوم) و استفاده از آن در فرمولاسیون پودر نوشیدنی فوری، می‌توان نوشیدنی‌های انرژی‌زا تولید کرد. هدف از این پژوهش، ابتدا ریزپوشانی کافئین در نانوکیتوزوم‌ها و بررسی ویژگی‌های نانوذرات تولیدی، و سپس به‌منظور بهبود ارزش تغذیه‌ای فرآورده‌های غذایی، تولید پودر نوشیدنی غنی‌سازی شده با نانوکیتوزوم کافئین و بررسی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی نوشیدنی‌های تولید شده است.

مواد و روش‌ها

مواد

پودر کافئین خالص از شرکت نیکوشیمی خریداری و در محیط عاری از رطوبت در دمای اتاق نگهداری گردید. اتانول ۹۶٪ و اسید استیک از شرکت مجللی، توین ۸۰ از شرکت مرک آلمان، لستین (P3556) و کلسترول (C8667) و نیز کیتوزان (50000-190000 Da) از شرکت سیگما آلدریچ آلمان تهیه شدند. شکر، اسانس خوراکی و اسیدسیتریک مورد استفاده در فرمولاسیون نوشیدنی از فروشگاه محلی خریداری گردید.

روش‌های تولید محصول و آزمون‌ها

محتوای کافئین

غلظت کافئین با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (BEL PHOTONICS مدل UV-M51، ایتالیا) در طول موج ۲۷۶ نانومتر تعیین، و منحنی استاندارد کافئین رسم شد ($y = 0.0035x + 0.0112$ $R^2 = 0.9988$) (Seyedabadi *et al.*, 2021).

آماده‌سازی کیتوزوم‌های حاوی کافئین

از روش هیدراتاسیون لایه نازک مشابه روش سرابندی و همکاران (Sarabandi *et al.*, 2019a)، با اعمال برخی تغییرات برای آماده سازی نانوکیتوزومها استفاده شد. برای این منظور نانوکیتوزوم‌های حاوی کافئین در نسبت‌های وزنی ۱:۹، ۲:۸ و ۳:۷ لستین-کلسترول آماده شدند. در ادامه، مقادیر مختلف لستین در ۱۰ میلی‌لیتر اتانول به مدت ۲ ساعت روی همزن مغناطیسی هیتردار (آلفا مدل D500، ایران) همزده شد و یک شب در یخچال نگهداری گردید تا به خوبی هیدراته شود. سپس مقادیر ذکر شده کلسترول همراه با ۰/۰۲ گرم توین ۸۰ به نمونه‌های لستین هیدراته افزوده شد. محلول‌های نهایی پس از اختلاط کامل، به فلاسک ته‌گرد انتقال یافتند و با استفاده از دستگاه روتاری اواپراتور (Ika مدل RV 05 basic، آلمان) در دمای ۴۰ درجه‌ی سانتی‌گراد، مدت زمان ۲۰ دقیقه و در دور چرخشی ۶۰ rpm حلال آن‌ها تبخیر گردید. پس از تبخیر حلال، لایه‌ی نازکی در دیواره‌ی فلاسک ته‌گرد ایجاد شد. در ادامه، جهت هیدراته کردن لایه‌ی خشک شده، ۱۰ میلی‌لیتر بافر سدیم استات ۲۵۰ میلی‌مولار (جدول ۱) حاوی ۲۵ میلی‌گرم کافئین، به آن افزوده شد. پس از هیدراتاسیون کامل لایه‌ی لیپیدی تحت عمل همزنی، محلول لیپوزومی تهیه شده برای

کاهش اندازه‌ی ذرات تا مقیاس نانو توسط هموژنایزر (Ika مدل T25 digital، آلمان) به مدت زمان ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد (بالاتراز دمای انتقال فاز لستین) و در دور ۲۰ هزار هموژن گردید. در مرحله بعد، محلول‌های آماده شده به مدت ۱۵ دقیقه (۴۵ ثانیه روشن و ۱۵ ثانیه خاموش)، در حمام اولتراسونیک با فرکانس ۵۰ کیلوهرتز قرار داده شدند. سپس، محلول آماده شده کیتوزان (۱٪ (وزنی/حجمی) در اسید استیک) برای بدست آوردن لیپوزوم‌های پوشش داده شده با کیتوزان، به نانوساختارهای تولید شده اضافه گردید.

جدول ۱- غلظت سدیم استات و استیک اسید جهت تهیه بافر سدیم استات (حجم ۱ لیتر، غلظت ۱ مولار)

Table 1- Concentration of sodium acetate and acetic acid to prepare sodium acetate buffer (1L,1M)

pH	غلظت استیک اسید Acetic acid concentration (gr/l)	غلظت سدیم استات Sodium acetate concentration (gr/l)
3.5	5.7	0.72

ارزیابی نانوکیتوزوم‌های حاوی کافئین

اندازه‌ی ذرات، توزیع اندازه ذرات و پتانسیل زتا

تعیین اندازه ذرات و پتانسیل زتای نانوکیتوزوم‌های کافئین، جهت تعیین نسبت بهینه لستین-کلسترول، توسط دستگاه DLS (HORIBA مدل ZS100، ژاپن) صورت گرفت. به‌منظور افزایش فاصله بین ذرات و جلوگیری از اثرات پراکندگی مختلف، نمونه‌های کیتوزومی به نسبت ۱ به ۱۰ با آب مقطر رقیق شدند. اندازه‌گیری برای تمامی نمونه‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و طی سه مرحله تکرار انجام گرفت (Homayoonfal *et al*., 2021).

بازده ریزپوشانی (EE)[1] کافئین

برای تعیین مقادیر بازده ریزپوشانی، در ابتدا ۱۰ میلی‌لیتر از محلول نانوکیتوزومی، به منظور جداسازی کافئین آزاد (ریزپوشانی نشده) به مدت ۱۵ دقیقه در دور ۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید (Hettich مدل universal centrifuge، آلمان). سپس جداسازی مایه‌رویی از لیپوزوم‌های ته‌نشین شده و اندازه‌گیری حجم آن‌ها صورت گرفت. در ادامه ۲ میلی‌لیتر از مایه‌رویی با ۱ میلی‌لیتر کلروفرم (نسبت ۲ به ۱) ترکیب شده و به مدت ۱۰ دقیقه با دستگاه شیکر به خوبی تکان داده شد تا غشای لیپوزومی به خوبی تخریب شده و کافئین آزاد گردد. در ادامه فیلتراسیون محلول با استفاده از فیلتر سرسرنگی ۰/۴۵ میکرومتری انجام شد و میزان کافئین ریزپوشانی شده و ریزپوشانی نشده (آزاد) با استفاده از دستگاه اسپکتوفوتوتر در طول موج ۲۷۶ نانومتر اندازه‌گیری گردید (Tavakoli *et al*., 2018). با استفاده از رابطه‌ی (۱) درصد ریزپوشانی محاسبه گردید:

$$\text{ریزپوشانی}\ (\%) = \frac{\text{میزان کافئین کپسوله شده در کیتوزوم}}{\text{میزان کافئین موجود در کل محلول کیتوزومی}} \times ۱۰۰ \quad (۱)$$

پایداری محلول کیتوزومی کافئین در طی ۶۰ روز نگهداری

تعیین پایداری فیزیکی محلول کیتوزومی با نسبت بهینه لستین-کلسترول، در دمای محیط (۲۵ درجه سانتی‌گراد) به‌طور بصری و بررسی دو فاز شدن آن‌ها (ایجاد رسوب) در طی ۶۰ روز نگهداری، جهت بررسی ثبات سیستم کیتوزومی، صورت گرفت. همچنین، پایداری شیمیایی محلول با اندازه‌گیری مقدار کافئین آزاد و ریزپوشانی شده (بعد از تخریب دیواره‌ی کیتوزومی) در دمای محیط (۲۵ درجه سانتی‌گراد) و در روزهای ۱-۳۰ و ۶۰ مطابق روش ۲-۲-۱ از طریق رابطه‌ی (۲) محاسبه گردید (Pezeshky *et al*., 2016).

$$\text{پایداری}\ (\%) = \frac{\text{مقدار کافئین کپسوله شده (در روز } n \text{ ام)}}{\text{مقدار کافئین کپسوله شده در روز اول}} \times 100 \quad (۲)$$

طیف‌سنجی مادون قرمز (FTIR)[2]

طیف‌سنجی مادون قرمز (FTIR مدل TENSOR 27، کمپانی بروکر) جهت بررسی واکنش‌های احتمالی بین کافئین-فسفولیپید، برای هر یک از مواد دیواره شامل لستین، کلسترول و کیتوزان و نیز برای نمونه‌های پودر کافئین خالص، محلول کیتوزومی فاقد کافئین و محلول کیتوزومی حاوی کافئین با نسبت بهینه لستین-کلسترول در دامنه‌ی طول موج cm^{-1} ۴۰۰-۴۰۰۰ صورت گرفت.

آماده‌سازی نمونه‌های پودر نوشیدنی فوری

نمونه‌های پودر نوشیدنی با اختلاط شکر، اسید سیتریک، کنسانتره آبمیوه و اسانس میوه‌ای تهیه شدند (Kamel Rahimi *et al*., 2014). ترکیبات پودر نوشیدنی فوری مطابق استاندارد ملی ایران شماره ۴۷۱۴ می‌باشند. فرمولاسیون چهار تیمار نوشیدنی در جدول ۲ آورده شده است. نمونه‌ها با افزودن محلول آزاد کافئین در غلظت‌های ۳ و ۵ ٪ (حجمی/حجمی) و محلول نانوکیتوزومی کافئین در غلظت‌های ۳ و ۵

1- Encapsulation Efficiency

2- Fourier-Transform Infrared Spectroscopy

٪ (حجمی/حجمی) تهیه شدند. نمونه شاهد شامل تمام مواد تشکیل دهنده نوشیدنی، بجز کافئین به‌صورت آزاد یا کیتوزومی می‌باشد. پس از توزین و مخلوط کردن شکر، اسانس میوه‌ای و کنسانتره آب پرتغال، محلول کیتوزومی یا آزاد کافئین به ترکیب نوشیدنی‌ها اضافه شد و سپس pH نمونه‌ها با استفاده از اسید سیتریک روی ۴ تنظیم شده و محلول بنزوات سدیم ۰/۰۵ ٪ به آن‌ها افزوده گردید. در ادامه، مقداری آب جوش به‌منظور حل کردن کامل مواد و رسیدن به حجم نهایی ۱۰۰ میلی‌لیتر، به ترکیبات نوشیدنی‌ها افزوده شد. محلول‌های نوشیدنی تهیه شده در دمای ۴ °C نگهداری شدند.

جدول ۲- فرمولاسیون تیمارهای مختلف نوشیدنی*

Table 2- Formulation of different drink treatments*

ترکیبات نوشیدنی Drink ingredients	شاهد Control sample	F3	N3	F5	N5
شکر Sugar (g)	25	25	25	25	25
کنسانتره آبمیوه Juice concentrate (ml)	40	40	40	40	40
اسانس میوه‌ای Fruit essential oil (g)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
سیتریک اسید Citric acid (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
محلول کافئین Caffeine solution (ml)	0	3	3	5	5
محلول سدیم بنزوات ۰/۰۵ benzoate solution 0.05% (ml) Sodium	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1

N3: تیمار دارای ۳٪ محلول نانوکیتوزومی کافئین، F3: تیمار دارای ۳٪ محلول کافئین آزاد، N5: تیمار دارای ۵٪ محلول نانوکیتوزومی کافئین، F5: تیمار دارای ۵٪ محلول آزاد کافئین.

N3: treatment with 3% nanoliposomal caffeine solution, F3: treatment with 3% free caffeine solution, N5: treatment with 5% nanoliposomal caffeine solution, F5: treatment with 5% free caffeine solution.

* همه نمونه‌ها با آب جوش به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شدند.

All the treatments has been adjusted with boiled water to 100 mL volume.

ارزیابی نمونه‌های نوشیدنی غنی شده با کافئین

پس از تهیه نمونه‌های نوشیدنی ویژگی‌های حسی، رنگ، pH، اسیدیته‌کل و بریکس (میزان مواد جامد محلول) آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. سپس، نوشیدنی‌های تولید شده با استفاده از دستگاه خشک‌کن انجمادی (ZiRBUS مدل Vaco5، آلمان) به شکل پودر درآمدند تا ویژگی‌های شاخص انحلال‌پذیری آب و هیگروسکوپی آن‌ها مورد ارزیابی قرار گیرد.

ارزیابی حسی نوشیدنی

جهت تعیین سطح پذیرش و مقبولیت عصاره‌ی آزاد یا نانوکیتوزومی اضافه شده، نمونه‌ها مورد ارزیابی حسی قرار گرفتند. به این منظور ۱۰ نفر آموزش دیده در رنج سنی ۲۰ تا ۴۰ سال شامل ۵ زن و ۵ مرد برای شرکت در ارزیابی حسی برگزیده شدند. این افراد (مزه، طعم)، (بو، عطر)، (رنگ)، (احساس‌دهانی) و (پذیرش‌کلی) را بررسی کرده و براساس مقیاس هدونیک ۵ نقطه‌ای امتیاز دادند. امتیاز ۱ (بسیار بد)، امتیاز ۲ (بد)، امتیاز ۳ (متوسط)، امتیاز ۴ (خوب) و امتیاز ۵ (بسیار خوب) می‌باشد.

رنگ نوشیدنی

رنگ نمونه‌های نوشیدنی به منظور بررسی تفاوت رنگ بین نمونه‌های حاوی نانوکیتوزوم کافئین با سایر نمونه‌ها، از طریق تعیین دو شاخص a^* (redness) و b^* (yellowness) توسط دستگاه رنگ‌سنج لاویباند (مدل PFX880، انگلیس) در دمای محیط (۲۵ درجه سانتی‌گراد) و طی سه مرحله تکرار مورد ارزیابی قرار گرفت.

تعیین pH نوشیدنی

به‌منظور بررسی تأثیر واکنش‌های احتمالی بین مواد تشکیل‌دهنده‌ی نوشیدنی‌ها بر pH، طی یکماه نگهداری نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، اندازه‌گیری pH با استفاده از دستگاه pH سنج (Testo، مدل ۲۰۵، آلمان) در دمای محیط (۲۵ درجه سانتی‌گراد)

و طی سه مرحله تکرار انجام گرفت (طبق استاندارد ملی ایران شماره ۲۶۸۵).

تعیین اسیدیته‌کل نوشیدنی

به‌منظور بررسی تأثیر واکنش‌های احتمالی بین مواد تشکیل‌دهنده‌ی نوشیدنی‌ها بر اسیدیته کل، طی یک‌ماه نگهداری نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، اندازه‌گیری اسیدیته‌کل با استفاده از دستگاه pH سنج (Testo، مدل ۲۰۵، آلمان) به روش پتانسیومتری در دمای محیط (۲۵ درجه سانتی‌گراد) و طی سه مرحله تکرار صورت گرفت (طبق استاندارد ملی ایران شماره ۲۶۸۵).

اندازه‌گیری مقدار مواد جامد محلول (بریکس) نوشیدنی

به‌منظور تعیین میزان مواد جامد محلول موجود در نمونه‌های مختلف نوشیدنی طی مدت یک‌ماه نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، اندازه‌گیری بریکس نوشیدنی‌ها توسط دستگاه رفراکتومتر چشمی (huixia، مدل SBRA90، چین)، در دمای محیط (۲۵ درجه سانتی‌گراد) و طی سه مرحله تکرار صورت گرفت (طبق استاندارد ملی ایران شماره ۲۶۸۵).

ارزیابی پودر نوشیدنی حاوی کافئین

شاخص انحلال‌پذیری پودر نوشیدنی در آب

به‌منظور تعیین شاخص انحلال‌پذیری در آب، ۲/۵ گرم پودر نوشیدنی آماده شده با ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر در یک فالکون ۵۰ میلی لیتری به مدت زمان یک دقیقه توسط دستگاه ورتکس همزده شد. در ادامه نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در بن‌ماری ۳۷ °C حرارت داده شده و سپس به‌مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شدند (۳۵۰۰ rpm). مایه‌رویی در یک پلیت ریخته شد و درون آون ۱۰۵ °C تا رسیدن به وزن ثابت خشک گردید (این آزمایش در سه مرحله تکرار صورت گرفت). شاخص انحلال‌پذیری در آب (WSI)[1] با استفاده از رابطه (۳) محاسبه گردید (Jafari *et al*, 2017):

$$\text{WIS}\ (\%) = \frac{\text{وزن مایع رویی خشک شده (گرم)}}{\text{وزن نمونه اولیه (گرم)}} \times ۱۰۰ \qquad (۳)$$

هیگروسکوپی (میزان جذب رطوبت) پودر نوشیدنی

برای تعیین میزان هیگروسکوپی ۲ گرم از هر نمونه درون پلیت ریخته شده و داخل ظرف حاوی محلول اشباع سدیم‌کلرید با رطوبت نسبی ۷۵/۲۹ ٪ قرار داده شد. نمونه‌ها تا رسیدن به وزن ثابت توزین شدند (در سه مرحله تکرار). میزان هیگروسکوپی به صورت مقدار رطوبت جذب شده (بر حسب گرم) در هر ۱۰۰ گرم مواد جامد خشک بیان گردید (Cai & Corke, 2000).

تجزیه و تحلیل داده‌ها

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها در قالب طرح کاملا تصادفی و مقایسه‌ی میانگین آن‌ها با آزمون LSD ($P<۰/۰۵$) توسط نرم‌افزار آماری SAS صورت گرفت.

بحث و نتایج

ویژگی نانوکیتوزوم‌های حاوی کافئین

اندازه ذرات توزیع اندازه ذرات و پتانسیل زتا

متوسط اندازه و توزیع اندازه ذرات (شاخص پراکندگی ذرات) مهمترین مشخصه‌های نانوذرات هستند که بر پایداری فیزیکی، حلالیت، عملکرد بیولوژیکی، سرعت انتشار و پایداری شیمیایی آن‌ها اثرگذارند (Tamjidi *et al.*, 2013). نتایج حاصل از DLS برای نمونه‌های کیتوزومی تهیه شده با نسبت‌های مختلف لستین-کلسترول در جدول ۳ بیان شده است.

همانگونه که در جدول ۳ مشاهده می‌شود، افزایش مقدار کلسترول در ساختار کیتوزوم، منجر به افزایش اندازه ذرات گردید. در طول فرایند تبدیل ساختارهای لایه‌ای فسفولیپیدی به دو لایه‌های توده‌ای، کلسترول در میان حفره‌ها و فضاهای مولکولی ایجاد شده، ساکن شده و لذا باعث افزایش معناداری در اندازه‌ی وزیکول‌ها می‌گردد (Pezeshky *et al.*, 2016). همچنین، کلسترول برای تصاحب بخش‌های لیپوفیل (چربی‌دوست) در ساختار لیپوزوم، با مولکول‌های فسفولیپید رقابت کرده و در نتیجه باعث کاهش پیوستگی و انسجام غشا و افزایش اندازه نانوذرات می‌شود (Fang *et al.*, 2001). در مطابقت با نتیجه بدست آمده، در تحقیقی گزارش شد که با افزایش نسبت کلسترول به لستین، در تولید نانولیپوزوم‌های حاوی ویتامین C اندازه وزیکول‌ها افزایش می‌یابد (Liu & Park, 2010). در پژوهشی دیگر عنوان شد که میانگین قطر لیپوزوم‌های حاوی سفوکسیتین، با افزودن کلسترول به ساختار لیپوزومی افزایش می‌یابد (Wu *et al.*, 2004). همچنین، در تحقیق صورت گرفته توسط مالیروس و همکاران (Malheiros *et al.*, 2012)، گزارش شد که افزودن کلسترول به ساختارهای لیپوزومی حاوی نایسین، با افزایش اندازه ذرات همراه است.

1- Water Solubility Index

جدول ۳- اندازه ذرات، توزیع اندازه ذرات و پتانسیل زتا نمونه‌های کیتوزومی حاوی کافئین تهیه شده با نسبت‌های مختلف لستین-کلسترول

Table 3- Particle size, polydispersity index and zeta potential of chitosomal samples containing caffeine prepared with different Lecithin-Cholesterol ratios

نسبت لستین-کلسترول Lecithin: cholesterol (w:w)	میانگین وزنی قطر ذرات Z-Average (nm)	پتانسیل زتا zeta potential (mv)	توزیع اندازه ذرات Polydispersity index (PI)
9:1	133.3 ± 7.27[b]	40.96 ± 0.46[b]	0.419 ± 0.04[a]
8:2	298.3 ± 10.33[a]	45.16 ± 1.02[a]	0.360 ± 0.03[ab]
7:3	443.6 ± 6.76[b]	48.36 ± 0.55[b]	0.318 ± 0.02[b]

میانگین‌های با حرف کوچک متفاوت در هر ستون تفاوت معنی‌دار دارند (P<۰.۰۵).

Different letters in same column represent significant differences (P<0.05)

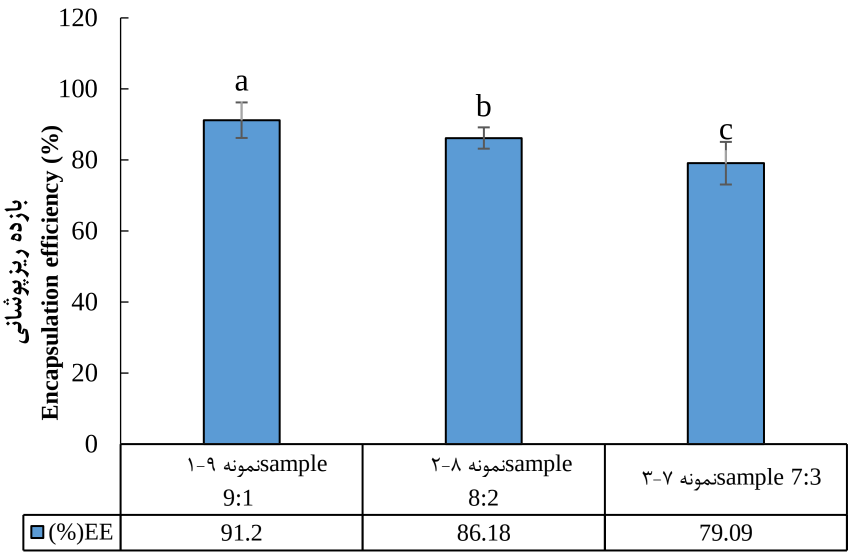
با این حال، نتایج پژوهش‌های گذشته نشان‌دهنده‌ی عدم وجود روند یکسان درمورد تأثیر کلسترول بر اندازه نهایی نانولیپوزوم‌ها می‌باشند. به‌طور مثال؛ در تحقیقی از نسبت‌های مختلف لستین-کلسترول برای تولید نانولیپوزوم‌های حاوی بتاکاروتن، استفاده شد؛ نتایج بدست آمده نشان داد که افزایش نسبت کلسترول به لستین تأثیر معنی‌داری در اندازه وزیکول‌ها ندارد (Pezeshky *et al*., 2016). از سوی دیگر در تحقیقی، افزودن کلسترول به ساختار لیپوزوم‌ها باعث کاهش اندازه ذرات گردید (Chorilli *et al*., 2013).

از دیگر پارامترهای مهم در خصوصیات لیپوزوم‌ها، پتانسیل زتا می باشد. آگاهی از پتانسیل زتا در کنترل تجمع و همجوشی لیپوزوم‌ها که از عوامل مهم مؤثر بر پایداری فرمولاسیون نانولیپوزومی هستند، مفید است (Mozafari, 2014). بطور کلی، نانوذرات با پتانسیل زتا بالاتر از ۳۰± میلی‌ولت، از دافعه الکترواستاتیک کافی بین ذرات برخوردار بوده و پایداری فیزیکی خوبی را از خود نشان می‌دهند (Sarabandi *et al*., 2019a). همانطور که در جدول ۳ مشخص است، نمونه‌های تهیه شده پتانسیل زتای بالایی دارند و با افزایش نسبت کلسترول به لستین، پتانسیل زتا افزایش قابل توجهی داشته است که بیانگر افزایش دافعه الکترواستاتیکی و پایداری بیشتر است. در تحقیقات مختلفی ذکر شده است که افزایش مقادیر کلسترول باعث افزایش پتانسیل زتا و بهبود پایداری نانولیپوزوم‌ها می‌شود (Pezeshky *et al*., 2016؛ Foteini *et al*., 2019; Mohammadi *et al*., 2014). در حقیقت افزایش پایداری نانوکیتوزوم، با افزایش مقادیر کلسترول را می‌توان به این واقعیت نسبت داد که گروه هیدروکسیل موجود در کلسترول، با گروه کولین موجود در سرقطبی لستین، پیوند هیدروژنی تشکیل می‌دهد و گروه کولین به داخل غشای لیپیدی کشیده می‌شود؛ در نتیجه بار منفی و به دنبال آن دفع الکترواستاتیک بین ذرات نیز افزایش می‌یابد (Miller, 2007). با این حال، پوشش‌دهی نمونه‌ها با محلول کیتوزان، بارسطحی لیپوزوم‌ها را به‌دلیل وجود گروه‌های آمین آزاد (بار مثبت)، به مقادیر مثبت تغییر داد (Shin *et al*., 2013).

با توجه به نتایج جدول ۳، با وجود این که افزودن کلسترول به ساختار کیتوزومی با افزایش اندازه نانوذرات همراه است، با این حال تأثیر مثبتی روی PI ایجاد نموده و سبب کاهش اختلاف اندازه ذرات گردید. مقدار PI معمولاً از ۰ تا ۱ متغیر است. مقادیر PI ≤ ۰/۱ نشانگر بالاترین کیفیت توزیع پراکندگی، مقادیر PI≤۰/۳ نشانگر مقادیر بهینه پراکندگی و مقادیر PI≤۰/۵ نیز مقدار قابل قبول است (Shah *et al*., 2014). در این پژوهش، مقادیر PI در محدوده قابل قبول قرار گرفت. در این پژوهش، نانوکیتوزوم‌های دارای نسبت ۱:۹ لستین-کلسترول به علت داشتن کوچکترین اندازه ذرات و پتانسیل زتاء مطلوب، به‌عنوان نسبت بهینه لستین-کلسترول برای آزمون‌های بعدی انتخاب شد.

بازده ریزپوشانی (EE) کافئین

بازده ریزپوشانی، مهمترین پارامتر نشان‌دهنده کارایی نانوحامل‌ها در حفظ و تثبیت اجزای هسته است (Sarabandi *et al*., 2019b). مقادیر بازده ریزپوشانی به اندازه و اجزای لیپوزوم‌ها از جمله فسفولیپیدها و تثبیت‌کننده‌ها (کلسترول) بستگی دارد (Shin *et al*., 2013). در این پژوهش بازده ریزپوشانی برای نسبت بهینه لستین-کلسترول (نسبت ۱:۹) و نیز سایر نسبت‌ها جهت بررسی تأثیر کلسترول بر این پارامتر، محاسبه گردید. نتایج حاصله در شکل ۱ گزارش شده است.



شکل ۱- بازده ریزپوشانی نمونه‌های کیتوزومی حاوی کافئین تهیه شده با نسبت‌های مختلف لستین-کلسترول

Fig. 1. Encapsulation efficiency of chitosomal samples containing caffeine prepared with different lecithin-cholesterol ratios

میانگین‌های با حرف کوچک متفاوت در هر ستون تفاوت معنی‌داری دارند (P<۰/۰۵).

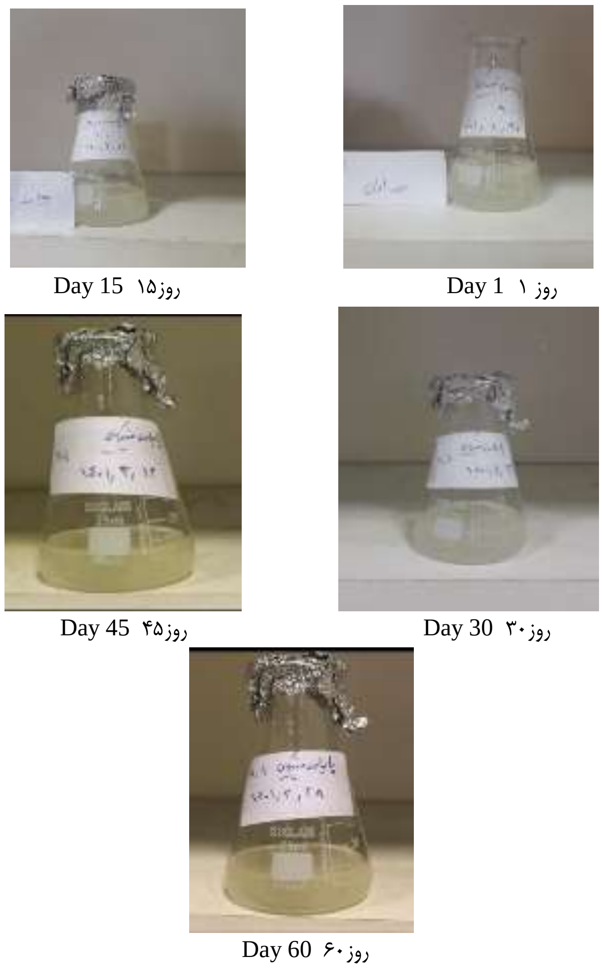
Different letters in same column represent significant differences (P<0/05)

همانگونه که اشاره شد ماهیت ماده فعال از عوامل اصلی تأثیرگذار بر کارایی ریزپوشانی لیپوزوم‌ها است. با توجه به این که بخش‌های آبدوست در ساختار لیپوزوم‌ها در مقایسه با بخش‌های آبگریز بیشتر است، کافئین به‌عنوان یک ترکیب هیدروفیل، می‌تواند در قسمت‌های آبدوست ساختار لیپوزوم یعنی سطح داخلی و خارجی غشا و نیز در فاز آبی فضای داخلی نانولیپوزوم‌ها قرار گیرد. در این تحقیق، در نسبت‌های مورد بررسی لسیتین- کلسترول، بازده ریزپوشانی کافئین بالا بود که می‌توان آن را به ماهیت آبدوستی بالای این ماده نسبت داد. همچنین مطابق شکل ۱، نسبت پایین کلسترول به لستین بیشترین میزان بازده ریزپوشانی را دارد و با افزایش این نسبت، بازده ریز پوشانی کاهش می‌یابد که نشان از کارایی پایین کلسترول در به دام انداختن کافئین است. در توضیح این پدیده می‌توان اظهار داشت که کلسترول تا مقادیر مشخصی به علت تقلیل سیالیت غشا سبب افزایش بازده ریزپوشانی می‌شود، اما اگر غلظت این ماده از حد معین فراتر رود، به علت گسستن غشای لیپوزومی، کاهش بازده ریزپوشانی و آزاد شدن مواد هسته را به دنبال دارد (Fan *et al*., 2008). در مطابقت با نتیجه‌ی این تحقیق، در پژوهشی بیان شد که افزایش غلظت کلسترول در ساختار لیپوزوم‌ها، به علت ایجاد محدودیت فضایی توسط این ماده و کاهش فضا برای بارگیری ماده فعال، میزان بازده ریزپوشانی را کاهش می‌دهد (Briuglia *et al*., 2015). در پژوهش صورت گرفته توسط لاریدی و همکاران (Laridi *et al*., 2003)، عنوان شد که افزایش محتوای کلسترول در ساختار لیپوزوم، به کاهش کارایی ریزپوشانی نایسین Z منجر می‌شود که علت آن را کاهش میل ترکیبی نایسین به دو لایه لیپیدی، در حضور مقادیر بالای کلسترول دانستند. همچنین، ژیپان وو و همکاران (Wu *et al*., 2016) نیز به این نتیجه رسیدند که میزان بازده ریزپوشانی لیپوزوم‌های حاوی لیزوزیم، با افزایش نسبت کلسترول به فسفاتیدیل کولین کاهش می‌یابد.

پایداری فیزیکی محلول کیتوزومی کافئین در طی ۶۰ روز نگهداری در دمای اتاق

پایداری فیزیکی محلول نانوکیتوزوم کافئین در شکل ۲ ارائه شده است. با توجه به شکل ۲ مشخص است که محلول نانوکیتوزومی کافئین با نسبت ۱:۹ لستین/ کلسترول، پایداری خوبی را در طول مدت زمان نگهداری در دمای محیط (۲۵ درجه سانتی‌گراد) از خود نشان داد. اندازه‌ی کوچکتر ذرات، سفتی غشا و ارتقاء پتانسیل زتا به علت استفاده از مقادیر بهینه کلسترول و همچنین ایجاد دافعه‌ی الکترواستاتیکی بالا به دلیل پوشش‌دهی با کیتوزان از دلایل اصلی این امر می‌توانند در نظر گرفته شوند. در این نمونه‌ی مورد بررسی، دوفازه شدن و ایجاد رسوب به میزان بسیار جزئی و در روز ۶۰ ام نگهداری مشاهده شد (شکل ۲). به‌دلیل اختلاف دانسیته ناچیز بین فسفولیپیدها (دولایه‌های لیپوزومی) و فاز پیوسته (محیط آبی)، جداسازی گرانشی در لیپوزوم‌ها بسیار آهسته است و اغلب رخ نمی‌دهد (Pezeshky *et al*., 2016). در مقابل، از جمله دلایل اصلی ناپایداری فیزیکی سیستم‌های لیپوزومی، ادغام دو لایه‌های لیپوزومی در اثر برخورد آن‌ها به یکدیگر و همجوشی غشاهای

لیپوزومی است. پایداری فیزیکی لیپوزوم‌ها به عوامل متعدد نظیر؛ متوسط اندازه ذرات، تعداد لایه‌ها، ساختار فسفولیپید و روش تولید لیپوزوم‌ها بستگی دارد (Tavakoli *et al.*, 2018). همچنین، نتایج پایداری شیمیایی محلول کیتوزومی کافئین نشان داد که پایداری کافئین در نانوکیتوزوم‌ها (نسبت ۱:۹ لستین-کلسترول)، طی ۶۰ روز نگهداری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، به‌طور معناداری از نمونه شاهد (کافئین ریزپوشانی نشده) بیشتر بوده است (P< ۰/۰۵). درصد پایداری کافئین در نانوکیتوزوم‌ها از ۸۹/۷۳٪ در روز ۳۰ ام به ۷۶/۸۶٪ در روز ۶۰ ام رسید؛ در حالی‌که؛ درصد پایداری کافئین در نمونه شاهد از ۷۸/۲۲٪ در روز ۳۰ ام به ۵۶/۵۱٪ در روز ۶۰ ام رسید. بالا بودن درصد پایداری کافئین در نانوکیتوزوم‌ها نشان‌دهنده مؤثر بودن روش ریزپوشانی در نگهداری هر چه بیشتر کافئین در طول زمان بوده است. در مطالعه انجام شده توسط سقاشیرپور (Saqashirpour., 2013)، درصد پایداری ویتامین E در نانولیپوزوم‌ها از ۶۸٪ در روز ۳۰ام به ۴۱٪ به روز ۶۰ام رسید.



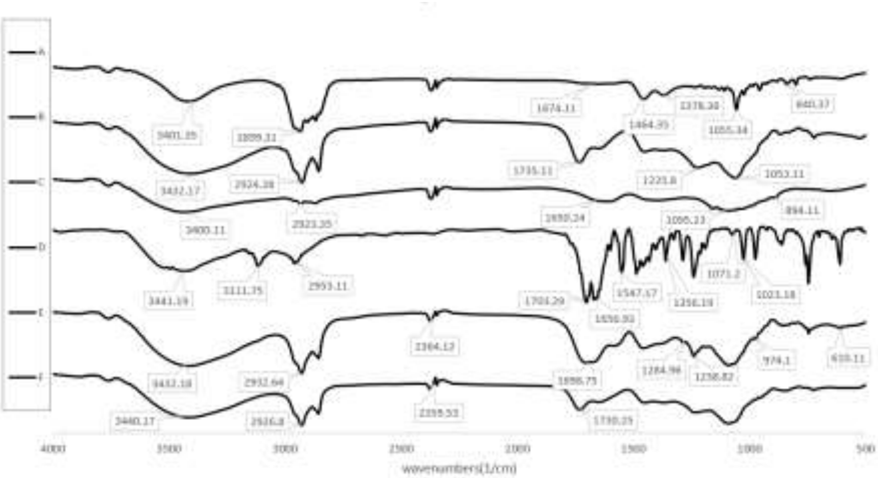
شکل ۲- پایداری فیزیکی محلول نانوکیتوزوم حاوی کافئین (نسبت ۱:۹ لستین/ کلسترول) طی ۶۰ روز نگهداری در دمای محیط (۲۵ درجه سانتی گراد)

Fig. 2. Physical stability of nanoliposome solution containing caffeine (9:1 lecithin/cholesterol ratio) during 60 days of storage at ambient temperature (25°C)

طیف سنجی مادون قرمز FTIR

نتایج مربوط به آزمون FTIR، در شکل ۳ گزارش شده است. در کلسترول طیف وسیع در محدوده‌ی ۳۴۰۰ cm^{-1} به پیوند کششی OH نسبت داده می‌شود. پیک‌های ۲۸۹۹، ۱۶۷۴، ۱۴۶۴ و ۱۳۷۸ cm^{-1} به‌ترتیب به ارتعاشات کششی متقارن CH_2، پیوند C=C در حلقه‌ی دوم کلسترول، ارتعاشات کششی نامتقارن گروه‌های CH_2 و CH_3 و ارتعاشات خمشی CH_2 و CH_3 مربوط می‌شوند. علاوه بر این، پیک‌های ۱۰۵۵ و ۸۴۰ cm^{-1} نیز به‌ترتیب مربوط به تغییر شکل حلقه

کلسترول و پیوند کششی C—C—C در مولکول کلسترول می‌باشند (Gupta *et al.*, 2014). در رابطه با لستین، پیک‌های جذبی ۳۴۳۲، ۲۹۲۴، ۱۷۳۵، ۱۲۲۵ و ۱۰۵۳ cm^{-1} به‌ترتیب مربوط به ارتعاشات OH، ارتعاشات کششی نامتقارن CH_2، گروه C=O، گروه‌های PO_2^- نامتقارن و C—O در $C—O—PO_2^-$ هستند (Mohan *et al.*, 2020). همچنین در کیتوزان، پیک‌های ۳۴۰۰، ۲۹۲۳، ۱۶۵۰ و ۱۰۹۵ cm^{-1} به‌ترتیب مربوط به پیوند کششی OH، پیوند کششی CH، پیوند کششی C=O در ناحیه آمیدI و پیوند کششی C—O هستند. همچنین، پیک ۸۹۴/۹۱ cm^{-1} نیز مربوط به پیوند گلیکوزیدی $\beta1\rightarrow4$ می‌باشد (Kumirska *et al.*, 2010 Wanule *et al.*, 2014). در رابطه با کافئین خالص با توجه به نتایج سیدآبادی و همکاران (Seyedabadi *et al.*, 2021)، پیک ۳۴۴۱cm^{-1} مربوط به پیوند کششی OH و پیک‌های ۳۱۱۱ و ۲۹۵۳ cm^{-1} به‌ترتیب به ارتعاشات کششی پیوندهای C—H و C—H گروه متیل مربوط هستند. همچنین، پیک‌های ۱۷۰۳ و ۱۶۵۶ cm^{-1} مربوط به گروه‌های C=O در ناحیه آمیدI می‌باشند. پیک‌های ۱۵۴۷، ۱۳۵۶، ۱۰۷۱ و ۱۰۲۳ cm^{-1} نیز به ترتیب با مناطق CH_3، C—C و C—OH در آمید II مرتبط هستند. در مقایسه کیتوزوم‌های خالی با کیتوزوم‌های بارگیری شده توسط کافئین، مشاهده شد که با ورود کافئین به نانوکیتوزوم‌های دارای نسبت ۱:۹ لستین-کلسترول، اکثر پیک‌های جذبی افزایش جذب را دارند. همچنین، پیک‌های جدید ۱۲۸۴/۹۶، ۱۲۳۸/۸۲، ۹۷۴/۱ و ۶۱۰/۱۱ cm^{-1} در نانوکیتوزوم‌های بارگیری شده با کافئین مشاهده گردید که احتمالاً می‌تواند در نتیجه‌ی برهمکنش بین مواد دیواره‌ی نانوکیتوزوم و کافئین باشد، که تأییدی بر بارگذاری موفقیت‌آمیز کافئین در نانوکیتوزوم‌ها است.



شکل ۳- نتایج FTIR (A= کلسترول، B= لستین، C=کیتوزان، D=کافئین، E= نانولیپوزوم‌های نسبت ۱:۹ لستین-کلسترول حاوی کافئین، F= نانولیپوزوم‌های نسبت ۱:۹ لستین-کلسترول فاقد کافئین)

Fig. 3. FTIR analysis results. (A=cholesterol, B= lecithin, C=chitosan, D=caffeine, E=lecithin-cholesterol 9:1 ratio nanochitosome containing caffeine, F=lecithin-cholesterol 9:1 ratio nanochitosome without caffeine)

ویژگی‌های نوشیدنی تهیه شده با کافئین

ارزیابی حسی نوشیدنی

نانوکیتوزوم‌های دارای نسبت ۱:۹ لستین-کلسترول، به‌علت داشتن بیشترین بازده ریزپوشانی، کوچکترین اندازه ذرات، توزیع اندازه و پتانسیل زتای مناسب و همچنین پایداری بالا در طی مدت زمان نگهداری، برای استفاده در فرمولاسیون نوشیدنی انتخاب شدند. نوشیدنی‌ها پس از تهیه شدن در فرمولاسیون‌های مختلف (جدول ۲) از نظر ویژگی‌های حسی مورد ارزیابی قرار گرفتند. مطابق نتایج گزارش شده در جدول ۴ جز طعم و پذیرش‌کلی، تفاوت معناداری در سایر ویژگی‌های حسی نمونه‌ها (رنگ، بو، احساس‌دهانی) مشاهده نشد (P>۰/۰۵). طعم نمونه‌های دارای کافئین ریزپوشانی شده (N3 و N5) و نمونه شاهد، از نظر آماری تفاوت معناداری را با نمونه‌های دارای کافئین آزاد (F3 و F5) داشت (P<۰/۰۵). در این میان، نمونه N3 طعم بهتری نسبت به نمونه N5 داشت و بیشترین امتیاز را نیز کسب کرد. در نمونه‌های F3 و F5، طعم تلخ احساس شد که این میزان تلخی در نمونه‌ی F5 به علت داشتن مقدار بیشتری از کافئین آزاد، بیشتر بود؛ درحالیکه در نمونه‌های حاوی نانوکیتوزوم (N3 و N5)، به علت قرارگیری کافئین درون حامل‌های لیپیدی، این تلخی پوشش داده شده بود. تفاوت در پذیرش‌کلی نمونه‌های نوشیدنی نیز به علت تفاوت در طعم نمونه‌ها بود که نمونه‌ی F5 با بیشترین میزان کافئین آزاد، کمترین

امتیاز را در این رابطه کسب کرد. در مجموع، پذیرش طعم نمونه‌های دارای کافئین ریزپوشانی شده، بیشتر از نمونه‌های دارای کافئین آزاد بود که این امر نشانگر موفقیت نانوحامل‌ها در پوشش‌دهی طعم تلخ کافئین است.

جدول ٤- ارزیابی ویژگی‌های حسی نمونه‌های نوشیدنی حاوی کافئین بصورت آزاد یا نانوریزپوشانی شده

Table 4- Evaluation of the sensory characteristics of free or nano-coated caffeine-containing beverage samples

نمونه Samples	رنگ Color	طعم (مزه) Taste	بو Odor	احساس دهانی Mouth feeling	پذیرش کلی General acceptance
شاهد Control sample	3.5 ± 0.85[a]	3.8 ± 0.70[a]	4.1 ± 0.74[a]	3.8 ± 0.63[a]	4.1 ± 0.88[a]
F3	3.6 ± 0.84[a]	2.9 ± 0.67[b]	3.8 ± 1.03[a]	3.5 ± 0.71[a]	3.9 ± 0.88[ab]
N3	3.7 ± 0.82[a]	4.1 ± 0.79[a]	3.9 ± 0.74[a]	4.1 ± 0.82[a]	4.5 ± 0.71[a]
F5	3.4 ± 1.07[a]	2.6 ± 0.70[b]	3.6 ± 0.84[a]	3.4 ± 0.70[a]	3.3 ± 0.82[b]
N5	3.8 ± 1.14[a]	3.9 ± 0.99[a]	4.3 ± 0.82[a]	3.9 ± 0.98[a]	4.3 ± 0.67[a]

F3: نوشیدنی دارای ٪۳محلول کافئین آزاد، N3: نوشیدنی دارای ٪۳ محلول نانوکیتوزومی کافئین، F5: نوشیدنی دارای ٪۵محلول کافئین آزاد، N5: نوشیدنی دارای ٪۵ محلول نانوکیتوزومی کافئین. میانگین‌های با حرف کوچک متفاوت در هر ستون تفاوت معنی داری دارند (P<۰.۰۵).

F3: treatment with 3% free caffeine solution, N3: treatment with 3% nanoliposomal caffeine solution, F5: treatment with 5% free caffeine solution, N5: treatment with 5% nanoliposomal caffeine solution. Different letters in same column represent significant differences (P<0.05).

جدول ٥- رنگ فرمولاسیون‌های مختلف نوشیدنی

Table 5- Color of different drink formulations

نمونه Samples	شاخص‌های رنگ Color indicators	
	Redness	Yellowness
Control sample شاهد	3.63 ± 0.36[a]	12.67 ± 0.58[a]
F3	3.72 ± 0.30[a]	13.66 ± 0.58[a]
N3	3.90 ± 0.06[a]	13.82 ± 1.73[a]
F5	3.81 ± 0.26[a]	12.00 ± 1.00[a]
N5	3.96 ± 0.10[a]	13.93 ± 2.08[a]

F3: نوشیدنی دارای ٪۳محلول کافئین آزاد، N3: نوشیدنی دارای ٪۳ محلول نانوکیتوزومی کافئین، F5: نوشیدنی دارای ٪۵ محلول کافئین آزاد، N5: نوشیدنی دارای ٪۵ محلول نانوکیتوزومی کافئین. میانگین‌های با حرف کوچک متفاوت در هر ستون تفاوت معنی‌داری دارند (P<۰.۰۵).

F3: treatment with 3% free caffeine solution, N3: treatment with 3% nanoliposomal caffeine solution, F5: treatment with 5% free caffeine solution, N5: treatment with 5% nanoliposomal caffeine solution. Different letters in same column represent significant differences (P<0.05).

رنگ نمونه‌های نوشیدنی

نتایج حاصل از بررسی شاخص‌های رنگ نمونه‌های مختلف نوشیدنی در جدول ۵ گزارش شده است. با توجه به نتایج جدول ۵، نمونه‌های دارای نانوکیتوزوم کافئین (N3 و N5) در هر دو شاخص مورد بررسی رنگ (قرمزی و زردی)، از نظر آماری تفاوت معنی‌داری با نمونه‌های حاوی کافئین آزاد (F3 و F5) و نمونه‌ی شاهد ندارند (P>۰/۰۵). در توضیح این پدیده می‌توان عنوان کرد که که عدم تفاوت در رنگ نمونه‌های مختلف نوشیدنی، می‌تواند مربوط به یکسان بودن مواد مؤثر بر رنگ نوشیدنی‌ها در نظر گرفته شود.

pH نوشیدنی

نتایج حاصل از اندازه‌گیری میزان pH نمونه‌های مختلف نوشیدنی در جدول ۶ گزارش شده است. با توجه به نتایج جدول ۶ مقدار میانگین pH برای تمامی نمونه‌ها پس از یک‌ماه نگهداری آن‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، در دامنه ۳/۵۷–۳/۵۴ بود که در محدوده‌ی استاندارد (۴-۳) برای پودر نوشیدنی‌های فوری قرار داشت. با توجه به یکسان بودن مقادیر مؤثر بر pH (اسانس میوه‌ای و اسید سیتریک)، تغییرات pH در نمونه‌ها جزئی است. در پژوهشی مقدار pH برای نمونه‌های نوشیدنی میوه‌ای تهیه شده با کنسانتره طبیعی میوه، بین ۳/۵۲–۳/۴۳ گزارش شد (Kamel Rahimi *et al*., 2014).

جدول ٦- pH نمونه‌های مختلف نوشیدنی

Table 6- pH of different drink samples

نمونه Samples	pH
شاهد Control sample	3.57 ± 0.005ᵃ
F3	3.56 ± 0.01ᵃ
N3	3.54 ± 0.01ᵃ
F5	3.56 ± 0.01ᵃ
N5	3.55 ± 0.02ᵃ

F3: نوشیدنی دارای ۳٪محلول کافئین آزاد، N3: نوشیدنی دارای ۳٪ محلول نانوکیتوزومی کافئین، F5: نوشیدنی دارای ۵٪ محلول کافئین آزاد، N5: نوشیدنی دارای ۵٪ محلول نانوکیتوزومی کافئین. عدم تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها با حروف مشابه نشان داده شده است (P>0.05).

F3: treatment with 3% free caffeine solution, N3: treatment with 3% nanoliposomal caffeine solution, F5: treatment with 5% free caffeine solution, N5: treatment with 5% nanoliposomal caffeine solution. Similar letters in the same column indicate no significant differences (P>0.05).

جدول ۷- اسیدیته کل نمونه‌های مختلف نوشیدنی

Table 7- Total acidity of different drink samples

نمونه Samples	اسیدیته کل Total acidity (grams of citric acid/100 grams of drink)
شاهد Control sample	3.36 ± 0.15ᵃ
F3	3.34 ± 0.15ᵃ
N3	3.31 ± 0.15ᵃ
F5	3.26 ± 0.10ᵃ
N5	3.29 ± 0.10ᵃ

F3: نوشیدنی دارای ۳٪محلول کافئین آزاد، N3: نوشیدنی دارای ۳٪ محلول نانوکیتوزومی کافئین، F5: نوشیدنی دارای ۵٪ محلول کافئین آزاد، N5: نوشیدنی دارای ۵٪ محلول نانوکیتوزومی کافئین. عدم تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها با حروف مشابه نشان داده شده است (P>۰.۰۵).

F3: treatment with 3% free caffeine solution, N3: treatment with 3% nanoliposomal caffeine solution, F5: treatment with 5% free caffeine solution, N5: treatment with 5% nanoliposomal caffeine solution. Similar letters in the same column indicate no significant differences (P>0.05).

اسیدیته‌کل نوشیدنی

نتایج حاصل از اندازه‌گیری اسیدیته‌کل برحسب اسید سیتریک ($^{g}/_{100g}$)، برای نمونه‌های مختلف نوشیدنی در جدول ۷ گزارش شده است. مقدار میانگین اسیدیته‌کل برای تمامی نمونه‌ها پس از یکماه نگهداری در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، بین ۳/۳۶ –۳/۲۶ قرار داشت که در محدوده‌ی استاندارد (۴-۲) برای پودر نوشیدنی‌های فوری است. تغییرات جزئی در میزان اسیدیته‌کل نمونه‌های نوشیدنی، می‌تواند به دلیل یکسان بودن مقادیر مواد مؤثر بر اسیدیته باشد. در پژوهشی، مقدار اسیدیته‌کل برای نوشیدنی تهیه شده از پودر آب انبه ۳/۸ گزارش گردید (Akhter *et al*., 2010).

میزان مواد جامد محلول (بریکس) نوشیدنی

جدول ۸ درصد مواد جامد محلول در آب نمونه‌های نوشیدنی را نشان می‌دهد، که برای نمونه‌های مختلف در دامنه‌ی ۱۰/۴۱-۹/۰۸ قرار داشت که در محدوده‌ی استاندارد (۱۱-۸) برای پودر نوشیدنی‌های فوری است. با توجه به نتایج جدول ۸، بریکس نوشیدنی تحت تاثیر فرمولاسیون بوده و از نظر آماری بین نمونه‌های مختلف نوشیدنی تفاوت معنی‌داری وجود داشت (P<۰/۰۵). با توجه به محلول بودن کافئین در آب (Sivrikaya, 2020)، نمونه‌ی F5 به‌دلیل داشتن بیشترین غلظت کافئین به‌صورت آزاد، بیشترین مقدار بریکس را دارد. بالا بودن مقادیر بریکس نمونه‌های N5 و N3 در مقایسه با بریکس نمونه‌ی شاهد، نشان‌دهنده‌ی نشت و رهایش کافئین از نانوکیتوزوم‌ها طی یک‌ماه نگهداری نمونه‌ها می‌باشد. در تحقیقی بریکس نوشیدنی‌های تهیه شده از کنسانتره‌ی میوه‌ها بین ۱۱/۲۵ -۱۱ گزارش گردید که بسته به غلظت مواد فرمولاسیون، متفاوت بود (Kamel Rahimi *et al*., 2014).

ویژگی‌های پودر نوشیدنی فوری تهیه شده با کافئین

شاخص انحلال‌پذیری در آب (WSI) پودر نوشیدنی

WSI شاخص رفتار محصول در فاز آبی و یک معیار کلی برای تعیین کیفیت بازسازی پودر است.

جدول ۸- درجه بریکس نمونه‌های مختلف نوشیدنی

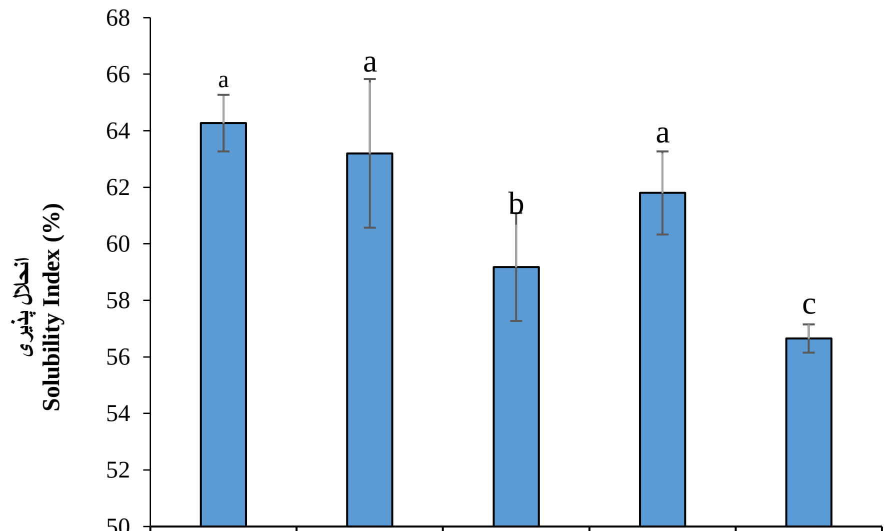
Table 8- Brix degree of different drink samples

نمونه **Samples**	بریکس **Brix**
شاهد Control sample	9.08 ± 0.14^{c}
F3	10.33 ± 0.38^{a}
N3	9.41 ± 0.14^{bc}
F5	10.41 ± 0.29^{a}
N5	9.58 ± 0.14^{b}

F3: نوشیدنی دارای ۳٪ محلول کافئین آزاد، N3: نوشیدنی دارای ۳٪ محلول نانوکیتوزومی کافئین، F5: نوشیدنی دارای ۵٪ محلول کافئین آزاد، N5: نوشیدنی دارای ۵٪ محلول نانوکیتوزومی کافئین. میانگین‌های با حرف کوچک متفاوت در هر ستون تفاوت معنی‌داری دارند (P<۰.۰۵).

F3: treatment with 3% free caffeine solution, N3: treatment with 3% nanoliposomal caffeine solution, F5: treatment with 5% free caffeine solution, N5: treatment with 5% nanoliposomal caffeine solution. Different letters in same column represent significant differences (P<0.05).

برای مصرف کنندگان، بازسازی سریع و کامل محصولات پودری یکی از شاخص‌های اصلی جهت ارزیابی کیفیت می‌باشد (Jafari *et al.*, 2017). مطابق نتایج حاصله در شکل ۴، شاخص انحلال‌پذیری آب نمونه‌های حاوی نانوکیتوزوم کافئین (N3 و N5)، از نظر آماری تفاوت معناداری را با سایر نمونه‌ها دارد (P<۰/۰۵)؛ پایین بودن این شاخص در نمونه‌های N3 و N5 را می‌توان به ماهیت آبگریزی لیپیدهای سازنده دیواره کیتوزوم (لستین و کلسترول) و حلالیت پایین کیتوزان در آب، نسبت داد. در تحقیقی مقدار WIS، برای پودر ژله حاوی آنتوسیانین ریزپوشانی شده با حامل‌های کربوهیدراتی مختلف بین ۹۶-۹۴ درصد گزارش شد، دلیل بالا بودن مقادیر WIS در این تحقیق، حلالیت بالای مواد کربوهیدراتی در آب عنوان شد (Mahdavi *et al.*, 2016).



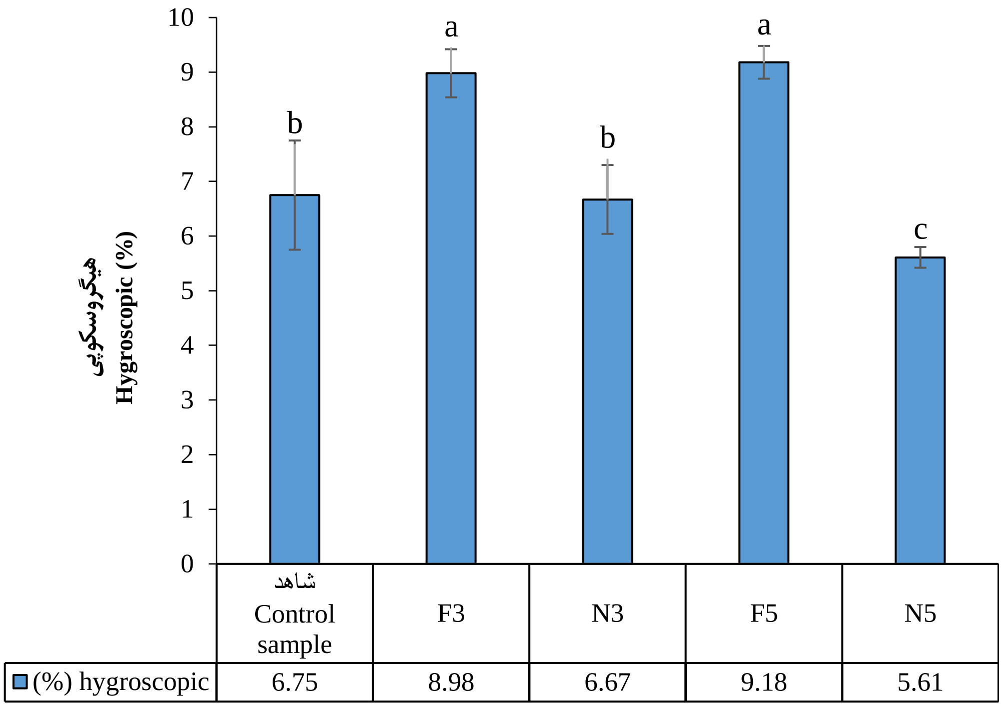
	شاهد Control sample	F3	N3	F5	N5
(%) WIS	64.27	63.2	59.18	61.8	56.65

شکل ٤- انحلال پذیری نمونه‌های مختلف پودر نوشیدنی

Fig. 4. Solubility of different drink powder samples

F3: نوشیدنی دارای ۳٪ محلول کافئین آزاد، N3: نوشیدنی دارای ۳٪ محلول نانوکیتوزومی کافئین، F5: نوشیدنی دارای ۵٪ محلول کافئین آزاد، N5: نوشیدنی دارای ۵٪ محلول نانوکیتوزومی کافئین. میانگین‌های با حرف کوچک متفاوت در هر ستون تفاوت معنی‌داری دارند (P<۰.۰۵).

F3: treatment with 3% free caffeine solution, N3: treatment with 3% nanoliposomal caffeine solution, F5: treatment with 5% free caffeine solution, N5: treatment with 5% nanoliposomal caffeine solution. Different letters in same column represent significant differences (P<0.05).



شکل ۵- هیگروسکوپی نمونه‌های مختلف پودر نوشیدنی

Fig. 5. Hygroscopicity of different samples of beverage powder

F3: نوشیدنی دارای ۳٪ محلول کافئین آزاد، N3: نوشیدنی دارای ۳٪ محلول نانوکیتوزومی کافئین، F5: نوشیدنی دارای ۵٪ محلول کافئین آزاد، N5: نوشیدنی دارای ۵٪ محلول نانوکیتوزومی کافئین. میانگین‌های با حرف کوچک متفاوت در هر ستون تفاوت معنی‌داری دارند (P<۰.۰۵).

F3: treatment with 3% free caffeine solution, N3: treatment with 3% nanoliposomal caffeine solution, F5: treatment with 5% free caffeine solution, N5: treatment with 5% nanoliposomal caffeine solution. Different letters in same column represent significant differences (P<0.05).

خاصیت هیگروسکوپی پودر نوشیدنی

نتایج حاصل از آزمون هیگروسکوپی برای نمونه‌های مختلف پودر نوشیدنی در شکل ۵ گزارش شده است. همان گونه که در شکل ۵ نیز مشخص است، از نظر آماری تفاوت معناداری بین میزان هیگروسکوپی نمونه‌های حاوی کافئین آزاد (F3 و F5)، با سایر نمونه‌ها (نمونه‌های حاوی نانوکیتوزوم کافئین و شاهد) وجود دارد (P<۰/۰۵)؛ که علت آن می‌تواند ناشی از وجود کافئین به‌صورت آزاد در این پودرها باشد، چرا که پودر کافئین میزان جذب رطوبت بالایی دارد (Mohammed, 2018). درحالیکه، در نمونه‌های N3 وN5 قرارگیری کافئین در حامل‌های لیپیدی، میزان جذب رطوبت توسط این ماده را کاهش داده است. پایین بودن میزان هیگروسکوپی پودر نوشیدنی‌های حاوی کافئین ریزپوشانی شده، مزیت‌هایی مانند بسته‌بندی و حمل و نقل آسان را به دنبال دارد. چرا که مواد غذایی با درصد بالای جذب رطوبت، به شرایط حمل‌ونقل ویژه و بسته‌بندی کنترل‌شده (استفاده از ظروف غیرقابل نفوذ به رطوبت) به‌خصوص در مناطق با رطوبت نسبی بالا نیاز دارند.

نتیجه‌گیری

در پژوهش حاضر، اثر نسبت‌های ۱:۹، ۲:۸ و ۳:۷ لستین-کلسترول بر تغییرات اندازه، پتانسیل زتا و توزیع اندازه ذرات معنی‌دار بود. نتایج نشان داد که با افزایش مقادیر کلسترول، اندازه و پتانسیل زتا ذرات افزایش می‌یابد. افزودن نسبت پایین کلسترول سبب افزایش بازده ریزپوشانی شد، اما با افزایش مقادیر آن بازده ریزپوشانی کافئین کاهش یافت. نتایج مربوط به آزمون پایداری فیزیکی، نشان‌دهنده‌ی پایداری بالای کافئین ریزپوشانی شده طی دوماه نگهداری در دمای محیط بود و رسوب به میزان جزئی در روز ۶۰ام ایجاد شد. نتایج حاصل از آزمون FTIR نشان‌دهنده‌ی بارگذاری موفقیت‌آمیز کافئین درون نانوکیتوزوم‌ها بود. نتایج بدست آمده از ارزیابی حسی نمونه‌های مختلف نوشیدنی نشان داد که استفاده از فناوری نانوریزپوشانی، برای پوشاندن طعم تلخ کافئین با موفقیت همراه بوده است. در نتیجه با تولید نانوکیتوزوم‌های کافئین و استفاده از آن در فرمولاسیون نوشیدنی‌ها، می‌توان نوشیدنی‌های انرژی‌زا و مطلوب، بدون نیاز به استفاده از مقادیر بالای ساکارز برای پوشاندن طعم تلخ کافئین، تولید کرد.

References

1. Akhter, S., Abid, H., Yasmin, A., & Masood, S. (2010). Preparation and evaluation of physical and chemical characteristics of instant mango juice powder. *Pakistan Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, *43*(2), 58–60.
2. Briuglia, M.L., Rotella, C., McFarlane, A., & Lamprou, D.A. (2015). Influence of cholesterol on liposome stability and on in vitro drug release. *Drug Delivery and Translational Research*, *5*(3), 231–242. https://doi.org/10.1007/s13346-015-0220-8
3. Cai, Y.-Z., & Corke, H. (2000). Production and properties of spray-dried *Amaranthus betacyanin* pigments. *Journal of Food Science*, *65*(7), 1248–1252. https://doi.org/101111/j.1365-2621.2000.tb10273.x
4. Chow, C.H., Kan, Y.C., & Ho, K.S. (2019). A simple and rapid gas chromatographic method for routine caffeine determination in beverages using nitrogen phosphorus detector. *Journal of Analytical Chemistry*, *74*(8), 764–770. https://doi.org/10.1134/S1061934819080045
5. Chorilli, M., Calixto, G., Rimério, T.C., & Scarpa, M.V. (2013). Caffeine encapsulated in small unilamellar liposomes: characerization and in vitro release profile. *Journal of Dispersion Science and Technology*, *34*(10), 1465–1470. https://doi.org/10.1080/01932691.2012.739535
6. Fan, M., Xu, S., Xia, S., & Zhang, X. (2008). Preparation of salidroside nano-liposomes by ethanol injection method and in vitro release study. *European Food Research and Technology*, *227*(1), 167–174. https://doi.org/10.1007/s00217-007-0706-9
7. Fang, J.Y., Hong, C.T., Chiu, W.T., & Wang, Y.Y. (2001). Effect of liposomes and niosomes on skin permeation of enoxacin. *International Journal of Pharmaceutics*, *219*(1–2), 61–72. https://doi.org/10.1016/S0378-5173(01)00627-5
8. Foteini, P., Pippa, N., Naziris, N., & Demetzos, C. (2019). Physicochemical study of the protein–liposome interactions: Influence of liposome composition and concentration on protein binding. *Journal of Liposome Research*, *29*(4), 313–321. https://doi.org/10.1080/08982104.2018.1468774
9. Ghorbanzade, T., Jafari, S.M., Akhavan, S., & Hadavi, R. (2016). Nano-encapsulation of fish oil in nano-liposomes and its application in fortification of yogurt. *Food Chemistry*. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.08.022
10. Gupta, U., Singh, V.K., Kumar, V., & Khajuria, Y. (2014). *Spectroscopic Studies of Cholesterol : Fourier*. *August 2015*. https://doi.org/10.1166/mat.2014.1161
11. Homayoonfal, M., Mousavi, S.M., Kiani, H., Askari, G., Desobry, S., & Arab-Tehrany, E. (2021). Encapsulation of berberis vulgaris anthocyanins into nanoliposome composed of rapeseed lecithin: A comprehensive study on physicochemical characteristics and biocompatibility. *Foods*, *10*(3). https://doi.org/10.3390/foods10030492
12. Ilgaz, S., Sat, I.G., & Polat, A. (2018). Effects of processing parameters on the caffeine extraction yield during decaffeination of black tea using pilot-scale supercritical carbon dioxide extraction technique. *Journal of Food Science and Technology*, *55*(4), 1407–1415. https://doi.org/10.1007/s13197-018-3055-8
13. Islam, M.T., Alencar, M., Mata, A., Paz, M., Matos, L.A., Sousa, J.M.C., & Melo-Cavalcante, A.A.C. (2016). Coffee: A health fuel-blot popular drinking. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, *8*(1), 1–7.
14. Jafari, S. M. (2017). An overview of nanoencapsulation techniques and their classification. In *Nanoencapsulation Technologies for the Food and Nutraceutical Industries*. Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809436-5.00001-X
15. Jafari, S., Ghalegi, M., & Dehnad, D. (2017). In fl uence of spray drying on water solubility index , apparent density , and anthocyanin content of pomegranate juice powder. *Powder Technology*, *311*, 59–65. https://doi.org/10.1016/j.powtec.2017.01.070
16. Kamel Rahimi, S., Elhami Rad, A., & Hemti Kakhki, A. (2014). Formulation and evaluation of fruit drink powder. *Innovations in Food Science and Technology*, *7*(4). (In Persian)
17. Kumirska, J., Czerwicka, M., Kaczyński, Z., Bychowska, A., Brzozowski, K., Thöming, J., & Stepnowski, P. (2010). Application of spectroscopic methods for structural analysis of chitin and chitosan. *Marine Drugs*, *8*(5), 1567–1636. https://doi.org/10.3390/md8051567
18. Laridi, R., Kheadr, E.E., Benech, R.O., Vuillemard, J.C., Lacroix, C., & Fliss, I. (2003). Liposome encapsulated nisin Z: Optimization, stability and release during milk fermentation. *International Dairy Journal*, *13*(4), 325–336. https://doi.org/10.1016/S0958-6946(02)00194-2
19. Liu, N., & Park, H. J. (2010). Factors effect on the loading efficiency of Vitamin C loaded chitosan-coated nanoliposomes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *76*(1), 16–19. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.09.041

20. Mahdavi, S.A., Jafari, S.M., Assadpour, E., & Ghorbani, M. (2016). Storage stability of encapsulated barberry's anthocyanin and its application in jelly formulation. *Journal of Food Engineering*, *181*, 59–66. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.03.003
21. Malheiros, P., da S., Sant'Anna, V., Barbosa, M., de S., Brandelli, A., & Franco, B.D.G. de M. (2012). Effect of liposome-encapsulated nisin and bacteriocin-like substance P34 on *Listeria monocytogenes* growth in Minas frescal cheese. *International Journal of Food Microbiology*, *156*(3), 272–277. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.04.004
22. Miller, W. L. (2007). Steroidogenic acute regulatory protein (StAR), a novel mitochondrial cholesterol transporter. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, *1771*(6), 663–676. https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2007.02.012
23. Mohammadi, M., Ghanbarzadeh, B., & Hamishehkar, H. (2014). Formulation of nanoliposomal vitamin D3 for potential application in beverage fortification. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, *4*(Suppl 2), 569–575. https://doi.org/10.5681/apb.2014.084
24. Mohammed, O. (2018). *Determination of Caffeine Level in Brands of Instant Coffee Available in Ethiopian Market Using Uv-Vis Spectrophotometry*.
25. Mohan, V., Naske, C.D., Britten, C.N., Karimi, L., & Walters, K.B. (2020). Hydroxide-catalyzed cleavage of selective ester bonds in phosphatidylcholine: An FTIR study. *Vibrational Spectroscopy*, *109*, 103055. https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2020.103055
26. Mozafari, M.R. (2014). Nanoliposomes : Preparation and Analysis Chapter 2 Nanoliposomes : Preparation and Analysis. *Methods in Molecular Biology*, *605*(May), 29–50. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-360-2
27. Muhamad, I.I., Abang Zaidel, D.N., Hashim, Z., Mohammad, N.A., & Abu Bakar, N.F. (2019). Improving the delivery system and bioavailability of beverages through nanoencapsulation. In *Nanoengineering in the Beverage Industry: Volume 20: The Science of Beverages*. Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816677-2.00010-7
28. Pezeshky, A., Ghanbarzadeh, B., Hamishehkar, H., Moghadam, M., & Babazadeh, A. (2016). Vitamin A palmitate-bearing nanoliposomes: Preparation and characterization. *Food Bioscience*, *13*, 49–55. https://doi.org/10.1016/j.fbio.2015.12.002
29. Sarabandi, K., & Jafari, S.M. (2020). Effect of chitosan coating on the properties of nanoliposomes loaded with flaxseed-peptide fractions: Stability during spray-drying. *Food Chemistry*, *310*, 125951. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125951
30. Saqashirpour, S. (2013). Nanoliposome production for simultaneous encapsulation of vitamin E and vitamin C by thermal method (Mozaffari). Tabriz University.
31. Sarabandi, K., Jafari, S.M., Mohammadi, M., Akbarbaglu, Z., Pezeshki, A., & Khakbaz Heshmati, M. (2019b). Production of reconstitutable nanoliposomes loaded with flaxseed protein hydrolysates: Stability and characterization. *Food Hydrocolloids*, *96*, 442–450. https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.05.047
32. Sarabandi, K., Mahoonak, A.S., Hamishehkar, H., Ghorbani, M., & Jafari, S.M. (2019a). Protection of casein hydrolysates within nanoliposomes: Antioxidant and stability characterization. *Journal of Food Engineering*, *251*, 19–28. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.02.004
33. Seyedabadi, M.M., Rostami, H., Jafari, S.M., & Fathi, M. (2021). Development and characterization of chitosan-coated nanoliposomes for encapsulation of caffeine. *Food Bioscience*, *40*(October 2020). https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100857
34. Shah, R., Eldridge, D., Palombo, E., & Harding, I. (2014). Optimisation and stability assessment of solid lipid nanoparticles using particle size and zeta potential. *Journal of Physical Science*, *25*(1), 59–75.
35. Shin, G.H., Chung, S. K., Kim, J.T., Joung, H.J., & Park, H.J. (2013). Preparation of chitosan-coated nanoliposomes for improving the mucoadhesive property of curcumin using the ethanol injection method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*(46), 11119–11126. https://doi.org/10.1021/jf4035404
36. Sivrikaya, S. (2020). A deep eutectic solvent based liquid phase microextraction for the determination of caffeine in Turkish coffee samples by HPLC-UV. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, *37*(3), 488–495. https://doi.org/10.1080/19440049.2020.1711972
37. Solghi, S., Emam-Djomeh, Z., Fathi, M., & Farahani, F. (2020). The encapsulation of curcumin by whey protein: Assessment of the stability and bioactivity. *Journal of Food Process Engineering*, *43*(6), e13403. https://doi.org/10.1111/jfpe.13403
38. Subramani, T. (2020). An overview of liposomal nano-encapsulation techniques and its applications in food and nutraceutical. *Journal of Food Science and Technology*. https://doi.org/10.1007/s13197-020-04360-2
39. Tamjidi, F., Shahedi, M., Varshosaz, J., & Nasirpour, A. (2013). Nanostructured lipid carriers (NLC): A potential delivery system for bioactive food molecules. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *19*, 29–43. https://doi.org/10.1016/j.ifset.2013.03.002

40. Tavakoli, H., Hosseini, O., Jafari, S.M., & Katouzian, I. (2018). Evaluation of physicochemical and antioxidant properties of yogurt enriched by olive leaf phenolics within nanoliposomes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *66*(35), 9231–9240. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b02759
41. Wanule, D., Balkhande, J.V., Ratnakar, P.U., Kulkarni, A.N., & Bhowate, C.S. (2014). Extraction and FTIR analysis of chitosan from American cockroach, *Periplaneta americana*. *International Journal of Engineering Science and Innovative Technology*, *3*(3), 299–304.
42. Wu, P.C., Tsai, Y.H., Liao, C.C., Chang, J.S., & Huang, Y. Bin. (2004). The characterization and biodistribution of cefoxitin-loaded liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*, *271*(1–2), 31–39. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2003.10.034
43. Wu, Z., Guan, R., Lyu, F., Liu, M., Gao, J., & Cao, G. (2016). Optimization of preparation conditions for lysozyme nanoliposomes using response surface methodology and evaluation of their stability. *Molecules*, *21*(6). https://doi.org/10.3390/molecules21060741